

Avaliação da expressão do gene *BDNF* em doenças neurodegenerativas

Oliveira Tânia¹, Pontes Manuela² & Neto Fani³

^{1,2} Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica, ESTSP,
Vila Nova de Gaia, PORTUGAL

³ Instituto de Histologia e Embriologia, Faculdade de Medicina do Porto,
Porto, PORTUGAL

¹orstania@live.com.pt, ²manuela_pontes86@hotmail.com, ³fanineto@med.up.pt

RESUMO

O Factor Neurotrófico Derivado do Cérebro (*BDNF*) está associado a processos de crescimento, diferenciação e sobrevivência das células neuronais. A expressão diferencial do *BDNF*, particularmente no hipocampo, está relacionada com a manifestação clínica de algumas doenças do foro psiquiátrico e cognitivo como a doença de Huntington, Alzheimer, depressão e esquizofrenia.

Este trabalho pretende dar conhecimento das técnicas utilizadas para avaliar a expressão do gene *BDNF*. As técnicas de *ELISA*, *IHC* e *Western blot*, por permitirem a avaliação precisa da expressão de *BDNF*, são úteis para uma melhor compreensão, diagnóstico e tratamento de algumas doenças neurodegenerativas.

Palavras – Chave: Factor Neurotrófico Derivado do Cérebro (*BDNF*), doenças neurodegenerativas, *ELISA*, Imunohistoquímica (*IHC*), *Western blot*.

The Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is associated with processes of growth, differentiation and survival of neuronal cells. The differential expression of BDNF, particularly in the hippocampus, is related to the clinical manifestation of some psychiatric and cognitive diseases like Huntington's disease, Alzheimer's, depression and schizophrenia.

This work aims to give knowledge of techniques used to evaluate the expression of the BDNF gene. The techniques of ELISA, IHC and Western blot, by allowing precise evaluation of the expression of BDNF, are useful for improved understanding, diagnosis and treatment of some neurodegenerative diseases.

Key - words: Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), neurodegenerative diseases, ELISA, Immunohistochemistry (IHC), Western blot.

1. INTRODUÇÃO

O Factor Neurotrófico Derivado do Cérebro (*BDNF*), pertence à família das neurotrofinas, está envolvido em processos de regulação e manutenção do sistema nervoso central e periférico (Angelucci et al., 2005).

O gene codificador da proteína *BDNF* localiza-se no cromossoma 11p13, desempenhando um papel fundamental na organização das redes neuronais e na plasticidade sináptica, principalmente a nível do hipocampo (Muglia et al., 2003; Peng et al., 2005).

Actualmente, relaciona-se a variação da expressão da proteína *BDNF* com o desenvolvimento de certas demências como a doença de Huntington, Alzheimer, depressão e esquizofrenia (Zuccato et al., 2001; Peng et al., 2005; Angelucci et al., 2005).

A doença de Huntington é um distúrbio genético autossómico dominante caracterizado por movimentos involuntários de todas as partes do corpo, deterioração das funções cognitivas e, com frequência, grave perturbação emocional. A proteína huntingtina mutada (repetição de poliglutamina) é a responsável pelo desenvolvimento desta doença. A transcrição do gene *BDNF* nos neurónios corticais é regulada

positivamente pela proteína huntingtina nativa, originando um pro-factor cuja função é a sustentação da integridade dos neurónios estriatais (Zuccato et al., 2001). A doença de Alzheimer é um distúrbio neurológico progressivo, caracterizado clinicamente por perda da memória, comprometimento cognitivo e, numa fase final, demência. Recentes estudos demonstram que o *BDNF* apresenta baixos níveis de expressão em estados precoces da doença, contribuindo para a perda da função sináptica e disfunção celular, subjacentes ao comprometimento cognitivo (Peng et al., 2005; Ferrer et al., 1999; Murer et al., 2001). A depressão traduz-se num transtorno emocional grave mediante um acontecimento, normalmente desproporcional relativamente à magnitude do facto e persiste para além de um período justificado. Em situações de stress emocional, como no caso da imobilização, os níveis de expressão do *BDNF* encontram-se diminuídos (Angelucci et al., 2005). Por outro lado, em condições de relevante exercício físico os níveis apresentam-se mais elevados (Cotman et al., 2002). A esquizofrenia é uma perturbação mental grave caracterizada por uma perda de contacto com a realidade (psicose), alucinações, delírios, pensamento anormal e, consequente, alteração do funcionamento social e laboral. Na esquizofrenia (Angelucci et al., 2005), estudos apontam para uma relação entre os polimorfismos no gene *BDNF*, verificados em indivíduos com esquizofrenia, e o aumento da expressão do gene *BDNF* (Angelucci et al., 2005).

Dada a relevância clínica destes valores, o uso de técnicas imunológicas precisas e sensíveis para avaliação dos níveis de expressão da proteína *BDNF* revelam-se fundamentais.

De entre as técnicas complementares ao diagnóstico clínico, destaca-se a técnica *Enzyme-linked immuno assay (ELISA)* que permite detecção e quantificação precisa da proteína *BDNF* em amostras de sangue e líquido cefaloraquidiano.

De forma a estimar a expressão da proteína *BDNF* nos tecidos, recorre-se à marcação específica *in situ* da proteína *BDNF* pelo método de imunohistoquímica (*IHC*), o qual se baseia na identificação de antígenos celulares ou tecidulares através do uso de anticorpos específicos.

A quantificação de intensidade da expressão da proteína *BDNF* em tecidos é estimada pela técnica de *Western blot*, em que se efectua a separação das proteínas a partir de um extracto proteico por electroforese em condições desnaturantes e a detecção da proteína *BDNF* através de anticorpos específicos para essa proteína.

Sendo assim, pretende-se com este trabalho dar conhecimento das técnicas utilizadas para avaliar a expressão do gene *BDNF* em doenças neurodegenerativas.

2. METODOS DE DETECÇÃO

2.1 ELISA

A proteína *BDNF* está presente no sangue e líquido cefaloraquidiano e, como tal, é possível a identificação e quantificação da proteína em indivíduos que apresentem sinais dos distúrbios como a doença de Huntington, Alzheimer, depressão e esquizofrenia (Zuccato et al., 2001).

O sangue e/ou líquido cefaloraquidiano deve ser colhido e submetido a uma centrifugação para colectar o soro para a realização da técnica *ELISA*. O método usado é o *sandwich* (Figura1), o qual consiste na detecção da proteína *BDNF* através da utilização de dois anticorpos monoclonais dirigidos a diferentes epítopes da proteína *BDNF*, um dos anticorpos (anticorpo de captura) está adsorvido aos poços da placa, enquanto o outro está conjugado com uma enzima (anticorpo de detecção), usualmente a peroxidase.

A primeira etapa consiste na adição do soro nos poços previamente revestidos com o anticorpo de captura. Durante o período de incubação a proteína *BDNF*, presente no soro, liga ao anticorpo adsorvido aos poços da placa.

Após uma lavagem dos poços da placa com uma solução tampão de lavagem para a remoção do anticorpo que não reagiu, é adicionado aos poços uma solução tampão de revelação. Esta solução tampão contém um substrato para a enzima que está acoplada ao anticorpo de detecção. Assim, a enzima reage com o substrato, originando um produto final colorido solúvel.

Neste método, a intensidade da coloração é proporcional à quantidade de proteína presente no soro. Quando se pretende quantificar a proteína *BDNF*, utiliza-se uma proteína padrão para realizar a curva padrão. A leitura é realizada num espectrofotómetro a um dado comprimento de onda de luz da região do visível do espectro electromagnético.

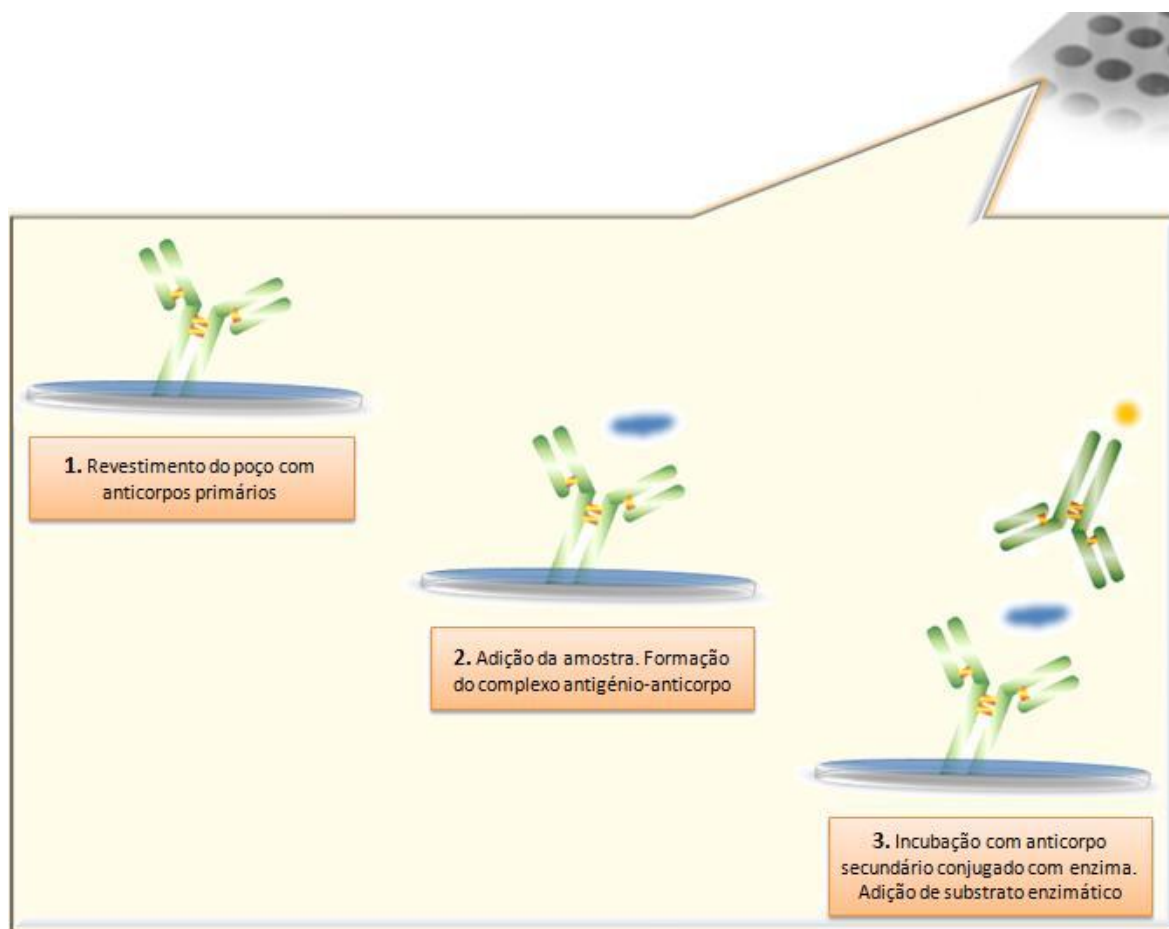


Figura 1. Esquema ilustrativo das principais etapas aplicadas na técnica de ELISA sandwich. 1. Utilização de uma placa revestida com anticorpos anti-BDNF. 2. Adição da amostra aos poços e incubação, para formação do complexo antígeno-anticorpo. 3. Incubação com anticorpo secundário acoplado a uma enzima. 4. Adição de um substrato cromogénio para a enzima e leitura colorimétrica por espectofotómetro.

2.2 Imunohistoquímica

Esta técnica é útil no estudo das regiões cerebrais onde é expressa a proteína *BDNF*, permitindo identificar as regiões do cérebro onde a proteína é expressa em situações fisiologicamente normais ou alteradas, bem como avaliar alterações da expressão da proteína (Chena et al., 2001).

O material biológico utilizado para a realização deste método são cortes histológicos de tecido cerebral previamente fixado, processado e embebido em parafina ou cortes de tecido congelado. Os tecidos fixados em formaldeído necessitam de um pré-tratamento para os epítopes da proteína ficarem acessíveis ao anticorpo, sendo necessária a realização de uma recuperação antigénica. Existem vários métodos de recuperação antigénica e a escolha do método a utilizar depende do tipo de tecido e da proteína que se pretende detectar. Para realizar a recuperação antigénica pode-se utilizar o calor ou, então, a digestão enzimática para romper ligações pépticas nas proteínas do citoesqueleto, para assim, permitir a difusão do anticorpo no tecido.

Vários métodos de *IHC* podem ser usados, destacando-se o método enzimático indirecto (Figura2) onde é usado um anticorpo acoplado a uma enzima ou a biotina, dirigido ao anticorpo primário para a detecção do complexo antígeno-anticorpo.

De forma a prevenir a ligação do anticorpo secundário ao tecido (ligações inespecíficas), é realizada uma incubação com soro do animal onde foram produzidos os anticorpos secundários, antes de proceder à incubação com o anticorpo primário. Quando a enzima acoplada ao anticorpo secundário é a peroxidase, é necessário inibir as peroxidases endógenas, através da incubação dos cortes histológicos numa solução de peróxido de hidrogénio a 3% para evitar uma marcação inespecífica.

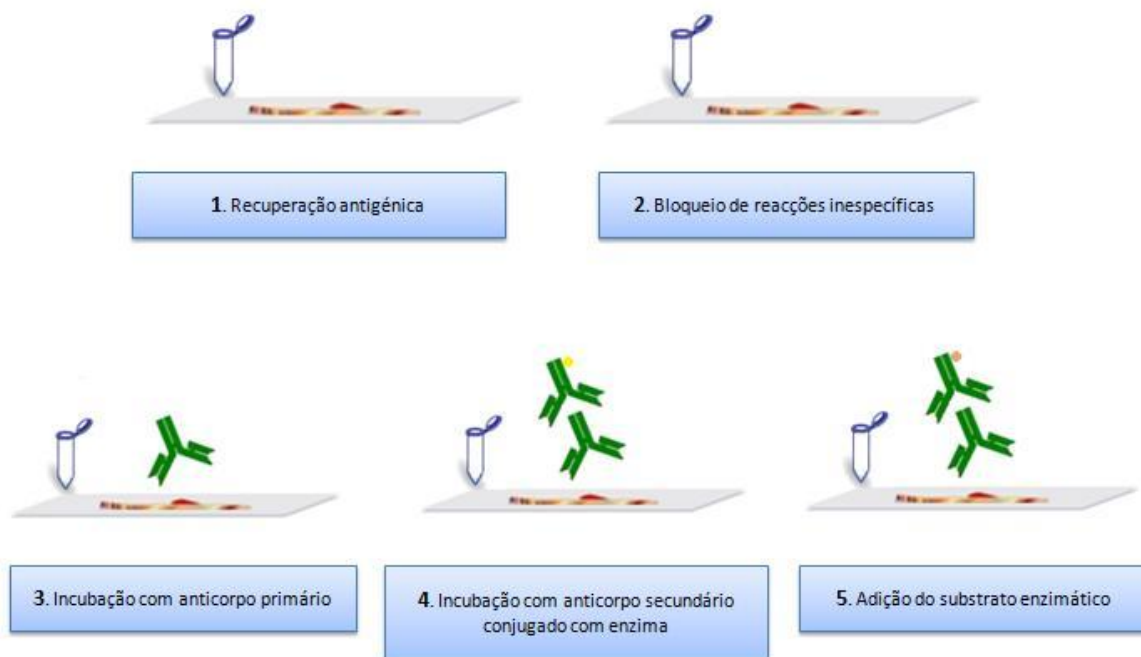


Figura 2. Esquema representativo das principais etapas do método imunohistoquímico enzimático indirecto. No primeiro passo está representada a recuperação antigénica por digestão enzimática, que permite a remoção de ligações cruzadas entre as proteínas causadas pela fixação do tecido com formaldeído. Para evitar as ligações inespecíficas do anticorpo secundário a epítopes do tecido, este é incubado com soro de bloqueio de ligações inespecíficas. Nos passos 3,4,5 está representada a marcação do tecido com anticorpos, pelo método indirecto, para amplificação de sinal. Após adição do substrato da enzima visualiza-se a marcação específica do BDNF no tecido.

2.3 Western blot

A aplicação da técnica de *Western blot* torna-se fundamental quando o objectivo é quantificar os níveis de uma dada proteína num extracto proteico obtido de um fluído orgânico ou de tecido sólido de uma dada área anatómica (Chen et al., 2003).

As amostras de tecidos *post mortem* são observadas microscopicamente, através de cortes de congelação corados pela hematoxilina e eosina de forma a seleccionar zonas de interesse a serem dissecadas. Após a dissecação, as amostras são congeladas em isopentano e arrefecidas em gelo seco, e, posteriormente, são homogeneizadas em meio de extracção, o qual deve conter, Tris/HCl, NaCl, EDTA, Triton X-100, NP-40, inibidores de fosfatases e de proteases. No final de permanecer cerca de uma hora em gelo, é realizada a centrifugação da amostra, sendo o sobrenadante recolhido para estudo. As células resultantes podem ser lisadas por meios ultrasónicos, e o extracto proteico obtido deve ser quantificado, por exemplo pelo método colorimétrico de *Bradford*.

Numa segunda etapa, as proteínas são submetidas a uma electroforese em gel de poliácridamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) (Figura3). Assim, as proteínas quando sujeitas a um campo eléctrico migram no sentido do ânodo, sendo separadas pelo peso molecular. De forma a inferir a massa molecular das proteínas separadas, deve ser usados marcadores de peso molecular, cuja massa molecular é conhecida.

A fase seguinte consiste na transferência por contacto das proteínas presentes no gel para uma membrana de nitrocelulose, sendo mantido o mesmo padrão da posição relativa do gel. Inicialmente, a membrana deve ser bloqueada com leite magro em pó para prevenir ligações dos anticorpos à própria membrana sendo, de seguida, a membrana incubada com o anticorpo primário, o qual estabelece uma ligação específica com a proteína formando o complexo antígeno-anticorpo. Para a detecção do complexo antígeno-anticorpo, é adicionado um anticorpo secundário, dirigido ao anticorpo primário, que se encontra conjugado a uma enzima. Após uma lavagem da membrana, com o tampão de lavagem, é adicionada uma solução tampão de revelação que contém um substrato luxogénico para a enzima. A enzima metaboliza o substrato luxogénico, originando um produto final que emite luz. A exposição da membrana a uma película de filme de raios X vai

impressioná-la. Após a revelação da película de raios X são visualizadas as bandas correspondentes à proteínas que se pretende detectar. Este processo de detecção não radioactivo tem vindo a substituir o processo radioactivo, no qual os anticorpos secundários estão marcados com um grupo radioactivo, uma vez que tem se tornado prejudicial para a saúde.

No final, a comparação entre a membrana e o gel permite a identificação da proteína em estudo e, eventualmente, o seu isolamento e caracterização. Quando o objectivo é quantificar o sinal obtido, realiza-se a electroforese da proteína padrão em quantidades diferentes para traçar a curva padrão ou detecta-se em simultâneo a proteína com expressão constitutiva para semi-quantificação.

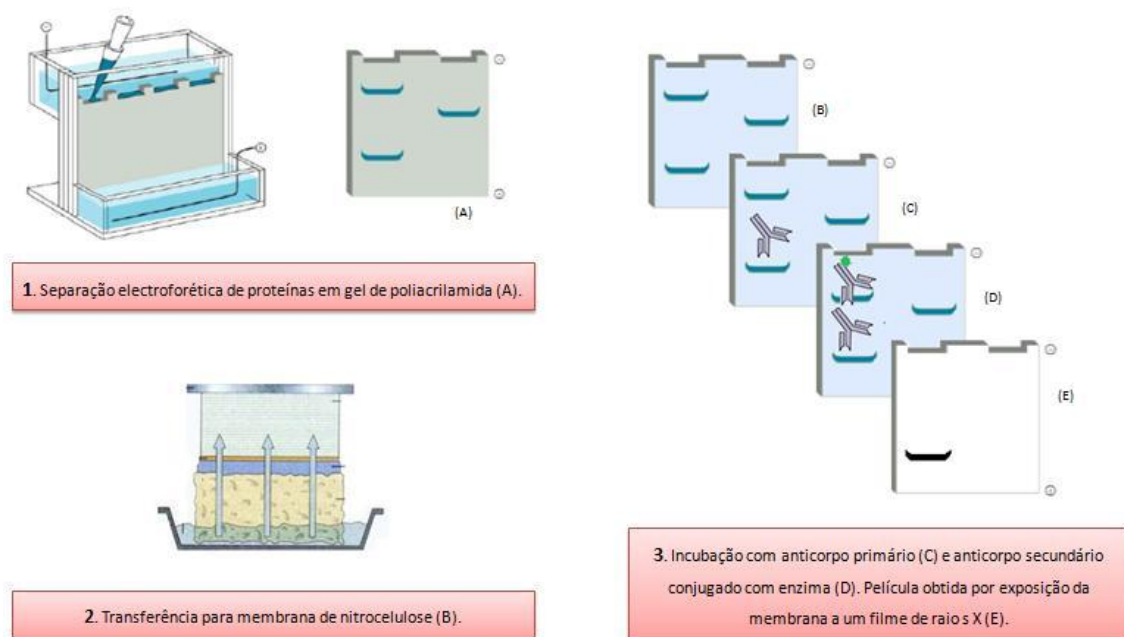


Figura 3. Esquema representativo da metodologia aplicada no Western blot, o qual pode ser aplicado a tecidos fixados e embebidos em parafina. O primeiro passo consiste na separação electroforética das proteínas pelo peso molecular. Segue-se a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (2B), incubação com anticorpos primários anti-BDNF (3C). Posterior incubação com enzima acoplada a anticorpos secundários (3D). A reacção resultante da adição do substrato enzimático detecta-se pelo sistema de quimioluminescência (3E).

3. CONCLUSÕES

Um diagnóstico clínico precoce e preciso das doenças neurodegenerativas torna-se imperativo para uma atitude terapêutica dirigida, de forma que cada doença tenha o tratamento mais específico possível. Deste modo, na selecção de exames diagnósticos deve ser tido em conta a informação que se pretende obter, por exemplo, qual a localização da proteína (*IHC*), ou qual a sua concentração (*Western blot*), assim como também se deve considerar o material biológico disponível, pois, por exemplo, no método *ELISA*, utilizam-se amostras de sangue ou líquido cefaloraquidiano, enquanto na *IHC* se utiliza tecido parafinado.

O método *ELISA* é usado na detecção e quantificação da expressão da proteína *BDNF* em amostras de sangue e líquido cefaloraquidiano, permitindo a utilização desses dados num diagnóstico clínico, assim como também pode ser usado para avaliar o efeito de um fármaco.

A *IHC* permite avaliar a expressão da proteína *BDNF*, dando uma resposta qualitativa. Este método é usado pois permite avaliar a localização da expressão da proteína em questão, destacando-se de outros métodos por fornecer esses mesmos dados.

O *Western blot* por sua vez é usado como um método complementar, pois fornece dados quantitativos da intensidade da expressão da proteína *BDNF*. Para além da desvantagem económica este método é relativamente mais moroso que a *IHC*, sendo que apenas é realizado quando há uma necessidade justificada de dados quantitativos.

Em suma, os exames diagnósticos baseados nas técnicas de *ELISA*, *IHC* e *Western blot*, permitem uma avaliação precisa da expressão da proteína *BDNF* em tecido *post mortem* e em doentes, podendo potencialmente contribuir para a melhoria do diagnóstico e tratamento de algumas doenças neurodegenerativas.

Agradecimentos: A execução deste trabalho contou com factores que conjugados entre si, geralmente contribuem para a obtenção de sucesso. Os referidos factores são: dedicação, empenho, apoio e orientação. Assim, este trabalho não poderia estar devidamente completado sem que nele constasse a manifestação de agradecimento a todos os que de forma directa ou indirecta apoiaram e ajudaram no desenvolvimento das ideias e aplicação prática das mesmas.

Ao Instituto de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina do Porto, por todo o apoio e disponibilidade prestados, sendo que sem esses factores seria improvável o desenvolvimento deste trabalho. Os sinceros agradecimentos.

À excelentíssima Sr.^a. Prof. Regina Silva, queremos expressar o mais profundo reconhecimento pelo conhecimento e orientação sempre presentes. Ao Sr. Prof. Ricardo Celestino devemos o estímulo e empenho manifestados para que desenvolvesse um bom trabalho. Os mais profundos agradecimentos.

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto - ESTSP, por proporcionar o I Congresso Internacional da Saúde Gaia - Porto, dando oportunidade aos alunos de nele participarem de forma activa e construtiva. O nosso agradecimento.

Aos amigos e colegas de trabalho que apoiaram incondicionalmente e que demonstraram sempre atenção e interesse por saber o estado de evolução do trabalho. Esperamos ter a possibilidade de retribuir com a mesma amizade.

Por fim, mas não menos importantes, a todos os familiares, pelo apoio e preocupação, pelo incentivo constante, mas acima de tudo por toda a compreensão, nos momentos de maior stress, e carinho sempre demonstrados.

A todos os que foram referidos, e os que não foram mencionados mas que são sempre recordados, deixamos o simples e sincero, Muito Obrigado!

4. REFERENCIAS

- Angelucci, F., Brenè, S. & Mathé, A.A., (2005). BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Molecular Psychiatry*, 10, 345-352.
- Muglia, P., Vicente, A.M., Verga, M., King, N., Macciardi, F., & Kennedy, J.L. (2003). Association between the BDNF gene and schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 8, 147-148.
- Peng, S., Wu, J., Mufson, E., & Fahnstock, M. (2005). Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 93, 1412-1421.
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B.R., goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M.E., Friedlander, R.M., Hayden, M.R., Timmusk, T., Sipione, S., & Cattaneo, E. (2001). Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science*, 293(5529), 493-498.

- Ferrer, I., Marín, C., Rey, M.J., Ribalta, T., Goutan, E., Blanco, R., Tolosa, E., & Martí, E. (1999). BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(7), 729-739.
- Murer, M.G., Yan, Q., & Vozari, R.R. (2001). Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 63(1), 71-124.
- Cotman, C.W., & Berchtold, N.C. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosciences*, 25(6), 295-301.
- Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M.E., Friedlander, R.M., Silani, V., Hayden, M.R., Timmusk, T., Sipione, S., & Cattaneo, E. (2001). Loss of Huntingtin-Mediated BDNF Gene Transcription in Huntington's Disease. *Science*, 293(5529), 493-498.
- Chen, B., Dowlatschahia, D., MacQueena, G.M., Wanga, J., & Younga, L.T. (2001). *BDNF* Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biological Psychiatry*, 4, 260-265.
- Chen, W.G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A.E., Griffith, E.C., Jaenisch, R., & Greenberg, M.E. (2003). Derepression of BDNF Transcription Involves Calcium-Dependent Phosphorylation of MeCP2. *Science*, 302(5646), 885-889.